

1 1. 酪農場で分離された牛伝染性鼻気管炎ウイルスの遺伝子学的検査及び疫学調査

大分家畜保健衛生所 畜産技術室¹⁾

○病鑑 中出圭祐、寺山将平、波津久航¹⁾

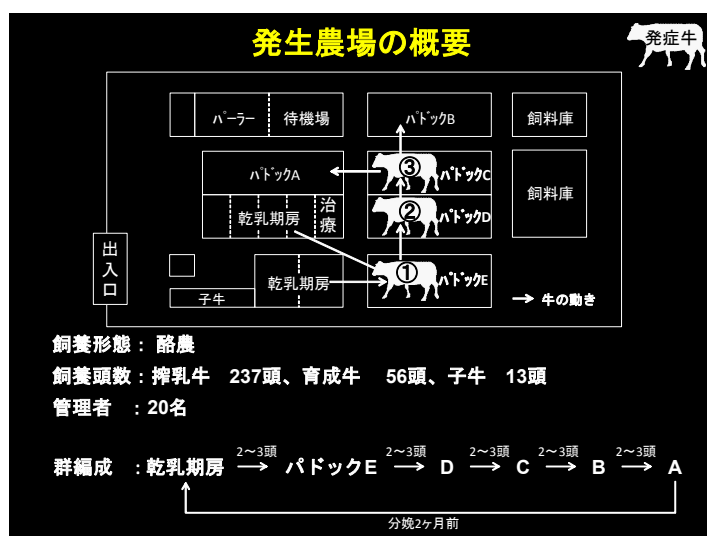
1 はじめに

県内の酪農場で牛伝染性鼻気管炎（IBR）が発生し、それら症例の概要と分離された牛伝染性鼻気管炎ウイルス（BHV-1）の遺伝子学的検査や疫学調査を行ったので報告する。

2 農場概要及び経過

(1) 発生農場の概要

飼養形態は酪農（飼養頭数：搾乳牛 237 頭、育成牛 56 頭、子牛 13 頭）であり、搾乳牛はパドック A からパドック E に分かれて飼養され、群編成は数日ごとに行われる。分娩前、乾乳期房で飼養されていた牛は分娩が終わるとパドック E に入り、順次 2～3 頭ずつ、数日ごとに群編成が行われ、パドック D、C、B、A へと移り、出産 2ヶ月前になると乾乳期房に入る。（図 1）



(図 1) 農場の概要及び発生状況

(2) 発生状況

- ① 2016年12月5日にパドックEの牛1頭（発症牛①）に呼吸器症状が認められたため、乾乳期房端の治療房に移し、臨床獣医師が治療を行った。同年12月7日に病性鑑定の依頼があり、鼻腔スワブを採材したところ、PCRでBHV-1の特異遺伝子を検出した。発症牛①は同年12月9日に死亡した。
- ② 同年12月12日にパドックD、パドックE及び乾乳期房の同居牛に呼吸器症状が散見されるようになり、翌13日に家保に再度病性鑑定の依頼があった。そのため、乾乳期房は5頭、パドックDは4頭、パドックEは4頭の鼻腔スワブ及び血清の採材を行い、検査を実施したところ、パドックDの1頭にBHV-1の特異遺伝子が検出された（発症牛②）。そのため、発症牛②は治療房に移動したが、同年12月15

日に死亡した。

- ③ 同年 12 月 16 日にパドック C で重度の呼吸器病を呈する牛（発症牛③）が確認され、治療房に移動した。発症牛③の鼻腔スワブを採材したところ、BHV-1 の特異遺伝子が検出された。発症牛③は同年 12 月 25 日に死亡した。また、翌年 1 月 11 日に乾乳期房 5 頭、パドック D3 頭、E4 頭の Post 血清を採材した。

3 病性鑑定

(1) 病性鑑定の材料と方法

① ウイルス学的検査

ア PCR 検査

発症牛①～③及び同居牛 12 頭の鼻腔スワブから核酸を抽出し、呼吸器病関連ウイルス（BHV-1、牛パラインフルエンザウイルス 3 型（PIV-3）、牛 RS ウイルス（BRSV）、牛コロナウイルス（BCV）、牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）、牛アデノウイルス（BAV））の PCR または RT-PCR 検査を実施した。

イ ウイルス分離検査

発症牛①～③及び同居牛 12 頭の鼻腔スワブを BT 細胞、HRT-18G 細胞、Vero 細胞、MDBK 細胞に接種した。

ウ ウイルス中和抗体検査

同居牛 12 頭について、ペア血清を用いて以下の呼吸器病関連ウイルスに対する中和抗体試験を実施した。

- ・牛伝染性鼻気管支炎ウイルス（BHV-1：756 株）
- ・牛パラインフルエンザウイルス 3 型（PI-3：YN-1 株）
- ・牛 RS ウイルス（BRSV：NMK7 株）
- ・牛コロナウイルス（BCV：掛川株）
- ・牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型（BVDV-1：Nose 株）
- ・牛アデノウイルス 7 型（BAV-7：Fukuroi 株）

② 細菌学的検査

発症牛①～③及び同居牛 12 頭の鼻腔スワブの細菌分離検査を実施した。

(2) 病性鑑定の結果

① ウイルス学的検査

ア PCR 検査（表 1）

発症牛①～③の鼻腔スワブから BHV-1 の特異遺伝子を検出した（前述）。

イ ウイルス分離検査（表 1）

発症牛①及び③の鼻腔スワブを接種した BT 細胞、Vero 細胞、MDBK 細胞では 1 代目に、HRT-18G 細胞では 2 代目に CPE が確認され、PCR 検査で BHV-1 と同定した。

ウ ウイルス中和抗体検査（表 2）

BHV-1 に対して 12 頭中 6 頭、BCV に対して 12 頭中 1 頭の中和抗体価の上昇が見られた。

② 細菌学的検査

発症牛①の鼻腔スワブから大腸菌群、グラム陽性球菌を分離した。

検体番号	採材日	パドック	PCR (BHV-1)	ウイルス分離 (BHV-1)	転帰
発症牛①	12/7	E	+	+	12/9死亡
発症牛②	12/13	D	+	-	12/14死亡
同居牛12頭		乾乳期房 D、E	-	-	
発症牛③	12/16	C	+	+	12/25死亡

(表1) ウイルス PCR 検査及びウイルス分離検査の結果

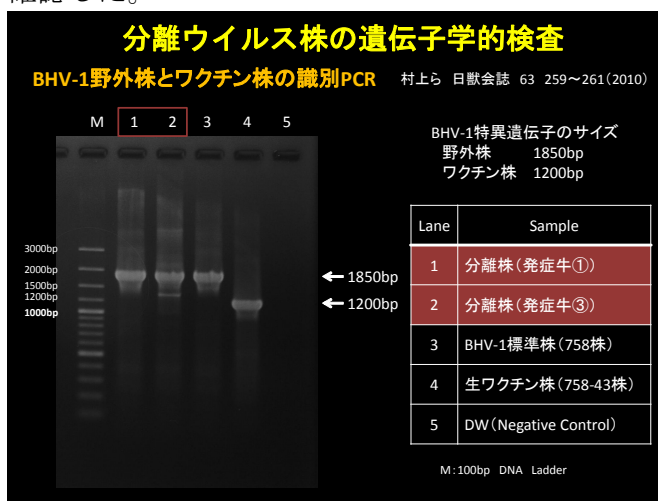
	BHV-1		BCV		
	No.	pre	post	pre	post
乾乳牛房	1	<2	16	32	64
	2	16	16	256 \leq	128
	3	4	32	32	64
	4	8	8	64	128
	5	2	16	32	128
パドックE	6	4	16	64	128
	7	32	16	256 \leq	64
	8	32	32	64	32
	9	16	32	64	128
パドックD	10	<2	32	16	16
	11	<2	<2	32	16
	12	<2	32	64	64

(表2) ウイルス中和抗体検査の結果

4 分離ウイルスの遺伝子学的検査

(1) BHV-1 野外株とワクチン株の識別 PCR (図2)

分離ウイルス 2 株について、野外ウイルス株と国内ワクチン株を識別する PCR を実施したところ、分離した 2 株から野外株と考えられるサイズのバンド (1850bp) を確認した。

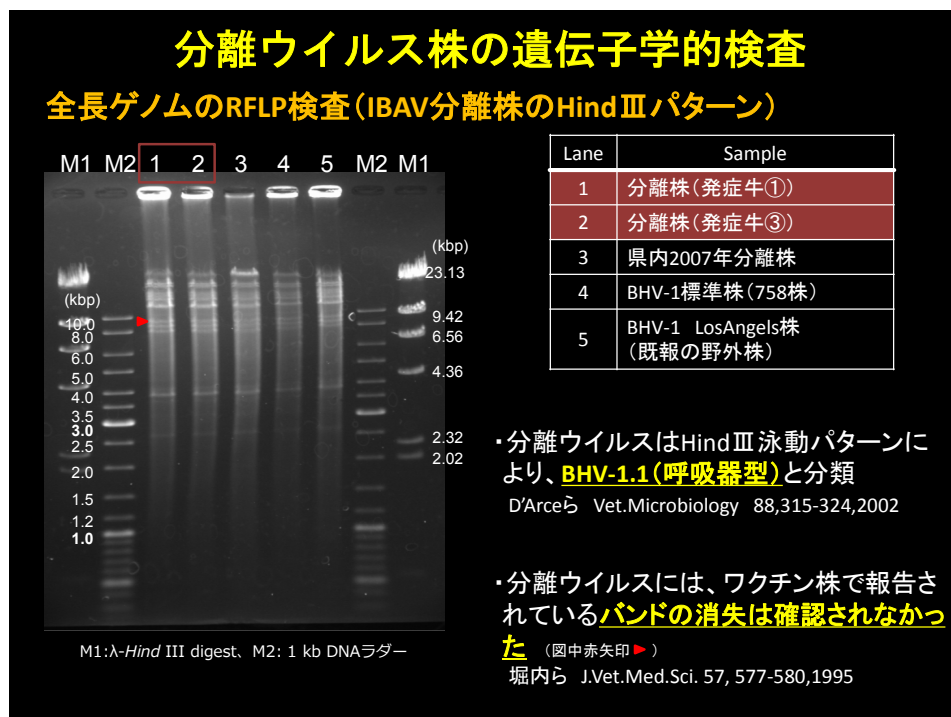


(図2) BHV-1 野外株とワクチン株の識別 PCR

(2) 全長ゲノムの RFLP 検査 (図 3)

分離された BHV-1 について分子疫学的考察を行うため、既報の BHV-1 亜型 1 (BHV-1.1) である LA 株との制限酵素切断パターンについて比較を行った (RFLP 検査)。なお、制限酵素は Hind III を用いた。

- ① 分離ウイルス 2 株の Hind III パターンは両株とも LA 株と同様であった。また、Hind III パターンによる分類で BHV-1.1 (呼吸器型) であることが確認された。
- ② 分離ウイルス 2 株では、国内ワクチン株で確認されているバンドの欠損 (図 3 : 赤矢印) は確認されなかった。

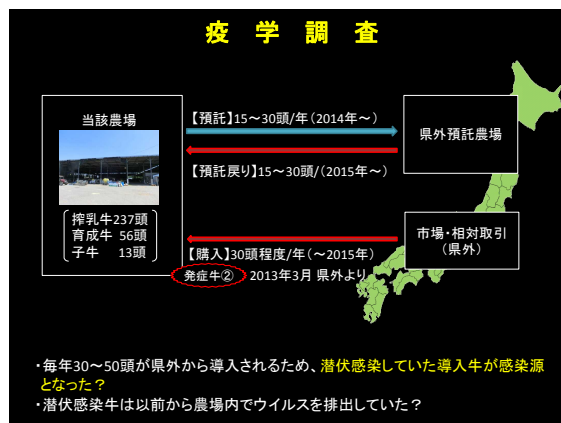


(図 3) 全長ゲノムの RFLP 検査

5 疫学調査

(1) 導入状況 (図 4)

当該農場は 2014 年より年間 15 頭から 30 頭の牛を県外農場に預託し、2015 年より預託終了した牛が導入されていた。さらに、増頭の目的で 2015 年まで年間 30 頭程度を購入していた。なお、発症牛②は 2013 年 3 月に購入された牛であった。



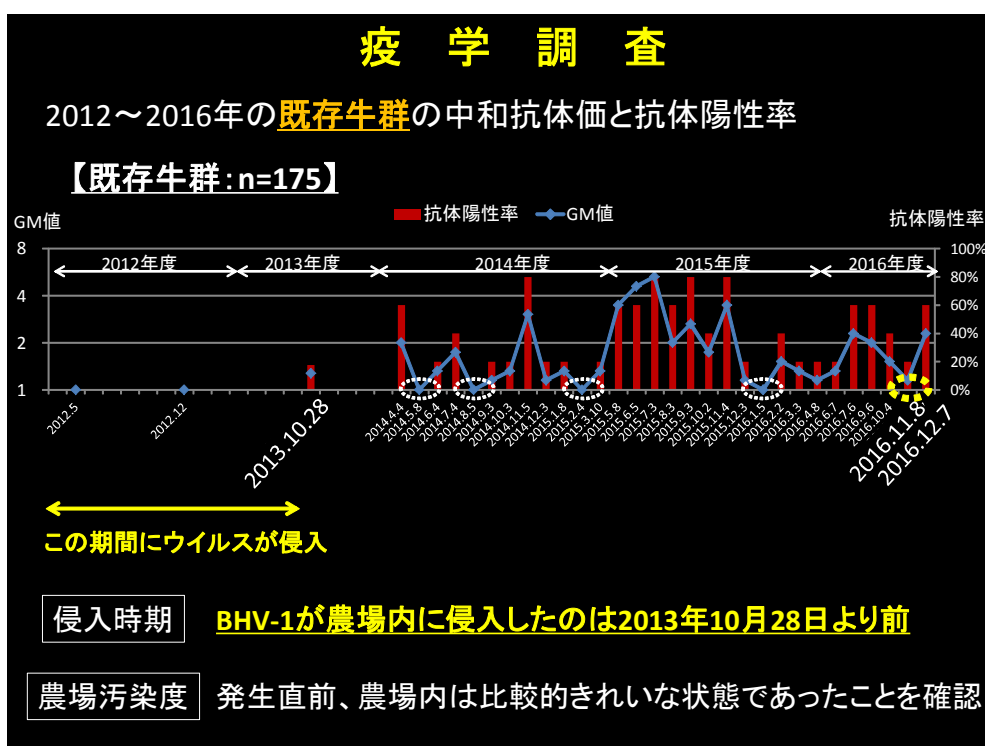
(図 4) 当該農場の導入状況

(2) 遡り調査

① 既存牛群の中和抗体検査 (図 5)

当該農場の保存血清 (175 検体) を使って、中和抗体検査を行ったところ、2012 年 5 月と 12 月の検体では GM 値は 1、抗体陽性率は 0 % と非常に低い値だったが、2013 年 10 月以降の検体では GM 値は 1 ~ 5.28、抗体陽性率は 0 ~ 80 % で推移していた。これらのことから、農場内にウイルスが侵入したのは 2013 年 10 月より前であることが推察された。

また、2013 年 10 月以降でも抗体陽性率や GM 値が非常に低い値を示すときがあった。さらに、今回の発症の約 1 ヶ月前である 2016 年 11 月 8 日の検体では抗体陽性率 20 %、GM 値 1.19 と非常に低い値となっていたため、一時的に農場内は清浄度が高い状態になっていたものと考えられた。



(図 5) 当該農場の既存牛群の遡り調査

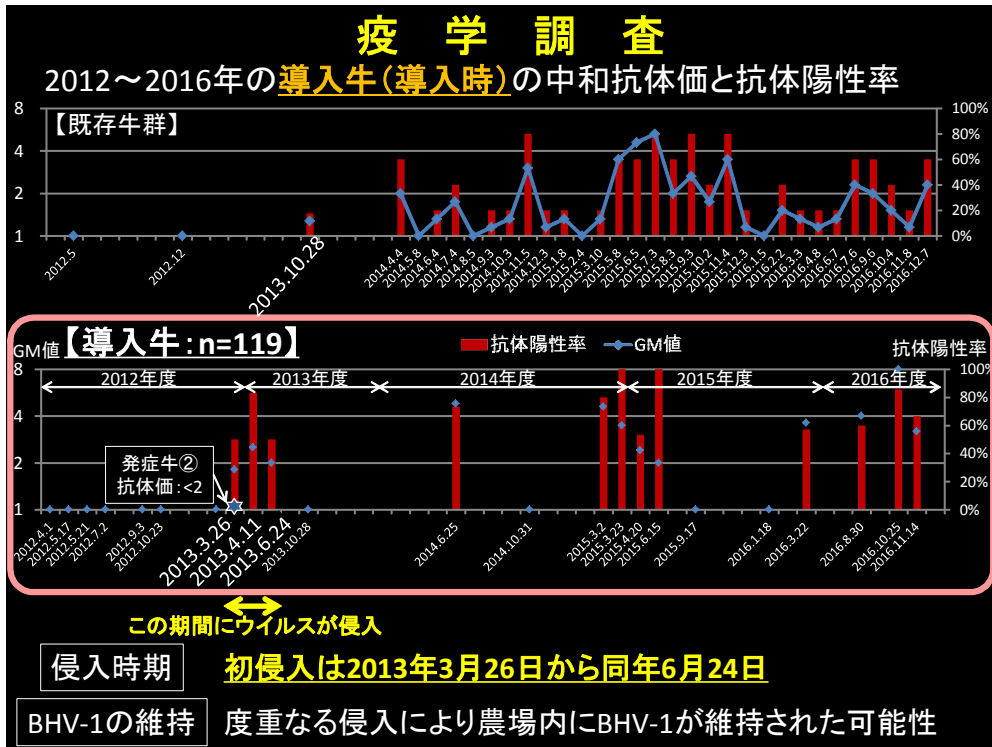
② 導入牛群の中和抗体検査 (図 6)

BHV-1 が当該農場に侵入した時期をさらに特定するため、導入時検査の際の保存血清 (119 検体) を用いて中和抗体検査を行ったところ、2012 年 4 月から 2013 年 3 月 12 日までの検体ではすべて中和抗体価は 2 倍未満だったが、2013 年 3 月 26 日以降の検体では、導入群の GM 値は 1 ~ 8、抗体陽性率は 0 ~ 100 % だった。

導入牛では 2013 年 3 月 26 日以降の検体で抗体陽性が確認され、既存牛群では同年 10 月 28 日に初めて抗体陽性が確認されたことから、農場内にウイルスが侵入したのは 2013 年 3 月 26 日から同年 6 月であり、初侵入後もたびたびウイルスは外部から持ち込まれ、農場内で維持されたと考えられた。

なお、発症牛②が導入されたのは 2013 年 3 月 26 日で、導入時の中和抗体価は 2

倍未満であった。



(図6) 当該農場の導入牛(導入時)の遡り調査

③ BHV-1の農場内伝播(表2)

抗BHV-1中和抗体価の結果を牛房ごとに見た場合、前血清の段階で乾乳期房やパドックEでは陽性がいたのにもかかわらず、パドックDではすべて抗体価は2倍未満であった。また、Post血清ではパドックDでも抗体が陽転した牛がいたこと、発症した牛が確認されたのもパドックDが一番遅かったことから、乾乳期房やパドックEで流行していたウイルスが牛の群編成につれてパドックDにも伝播したものと考えられた。

6 対策

(1) 牛呼吸器病6種混合ワクチン

乾乳期房の牛は分娩を間近に控えており、分娩後はパドックEに群編成され、搾乳も始まることから、今後もっともストレスにさらされると考えられた。このため、2016年12月、乾乳期房の牛に牛呼吸器病6種混合ワクチンを接種した。

(2) 鼻粘膜ワクチン

(1)のワクチンを接種後、呼吸器病症状が見られる個体がいなくなったが、翌年2月にも再度呼吸器病症状が見られたため、パドックAとEの牛に呼吸器病の鼻粘膜ワクチンを接種したところ、発生は終息した。

7 まとめと考察

- (1) 検査結果から、BHV-1.1(呼吸器病型:IBR)による牛伝染性鼻気管炎と診断した。
- (2) 分離されたウイルスは全長ゲノムのRFLP検査や識別PCRでワクチン株ではなく野

外株であることを確認した。

- (3) 今回の発生では乾乳期房・パドック E にいた感染牛から、群編成による牛の移動によりパドック D や C に伝播したと考えられた。
- (4) 2013 年 3 月下旬から同年 6 月に導入した牛によって、ウイルスは農場内に初めて侵入した可能性が考えられた。
- (5) ウイルスが初めて農場内に侵入してから、それ以降も導入牛によりウイルスは農場内にたびたび侵入していたと推察された。
- (6) 当該農場に対して、最もリスクの高い乾乳期房については呼吸器病 6 種混合ワクチン、次にリスクが高いパドック A 及び E については鼻粘膜ワクチンの接種を指導することにより発生は終息した。

【参考文献】

- 1) R.C.F.D'Arce, R.S.Almeida, T.C.Silva, A.C.Franco, F.Spilki, P.M.Roehe, C.W.Arns : Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5, *Veterinary Microbiology* 88 :315-324 (2002)
- 2) Motohiro Horiuchi, Noriko Yamazaki, Hidefumi Fukuoka, Takane Matsui, Michio Nakagawa, Naotaka Ishiguro, Morikazu Shinagawa : Restriction endonuclease analysis of bovine herpesvirus type isolates from calves with fetal encephalitis: Comparison with vaccine virus, *J.Vet.Med.Sci.* 57: 577-580,1995
- 3) Monika Engels, Carlo Giuliani, Peter Wild, Thomas M.Beck, Eva Loepfe, Robert Wyler : The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization : *Virus Research*, 6 : 57-73 (1986/87)
- 4) 村上賢二 : 日獣会誌 63 : 259-261 (2010)